

Auswirkungen kortikaler photothrombotischer Läsionen auf die Eigenschaften von HVA-Kalziumströmen im Hippokampus der Ratte

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Stephan Marcus Diehm
geboren am 17.05.1977
in Wertheim

Gutachter

- 1: Prof. Dr. O. Witte, Jena
- 2: PD Dr. M. Eiselt, Jena
- 3: Prof. Dr. R. Köhling, Rostock

Tag der öffentlichen Verteidigung: 01. Juni 2010

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	4
2.	Einleitung	
2.1	Der Schlaganfall	5
2.1.1	Klassifikation und Ätiologie	5
2.1.2	Auswirkungen	7
2.1.3	Therapie	9
2.2	Die Ionenkanäle der Hirnzellen	10
2.3	Der Hippokampus bei cerebraler Ischämie	11
3.	Ziele der Arbeit	13
4.	Material und Methoden	
4.1	Induktion der Läsion durch Photothrombose	14
4.1.1	Präparation	14
4.1.2	Induktion der Photothrombose	14
4.2	Durchführung der Untersuchungen	15
4.2.1	Isolierung der Neurone	15
4.2.2	Versuchsaufbau	17
4.2.3	Versuchsablauf	21
4.2.4	Statistik	22
5.	Ergebnisse	
5.1	Stromaktivierung	23
5.2	Spannungsabhängige Inaktivierung	25
5.3	Zeitabhängige Inaktivierung	29
5.4	Vergleich der Regionen CA1 und CA3	31
6.	Diskussion	32
7.	Schlussfolgerungen	37
8.	Literaturverzeichnis	40
9.	Danksagung	46
10.	Lebenslauf	47
11.	Ehrenwörtliche Erklärung	49

1. Zusammenfassung

Es gibt viele Hinweise darauf, dass eine räumlich begrenzte Ischämie des Gehirns auch in entfernten Hirnarealen die Eigenschaften des dortigen Gewebes verändern kann. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob nach einer kortikalen Photothrombose im somatosensorischen Kortex der Ratte Änderungen von Nervenzelleigenschaften im ungeschädigten ipsilateralen Hippokampus zu beobachten sind. Mit Hilfe der Ganzzellableitung, einer Variante der Patch-Clamp-Technik, wurden die Kalziumstromeigenschaften von Hippokampusneuronen (der Regionen CA1 und CA3) 7 Tage nach der Induktion eines kortikalen Infarktes untersucht. Beim Vergleich der Testgruppe mit der Kontrollgruppe zeigte sich eine signifikante Veränderung des halbmaximalen Potentials der Inaktivierung ($V_{h,i}$), während andere Parameter des Stromes unverändert blieben. Diese Änderungen des $V_{h,i}$ verhielten sich in der CA1- und in der CA3-Region gegenläufig: Im Mittel verschob sich $V_{h,i}$ bei CA3-Neuronen um 5,0 mV ins Positive (Testzellen: $-34,8 \pm 1,4$ mV; Kontrollzellen: $-39,8 \pm 1,6$ mV), während Neurone der CA1-Region im Mittel eine negative Änderung um 5,8 mV zeigten (Testzellen: $-36,6 \pm 1,5$ mV; Kontrollzellen: $-30,8 \pm 1,6$ mV). Es ist denkbar, dass diese Veränderungen in den beiden Hirnregionen auf die unterschiedlichen Anteile von Kalziumkanal-Typen (z.B. N- und L-Typ) am Gesamtzellstrom zurückzuführen sind. Die Daten zeigen, dass kleine kortikale Schädigungen zu ausgedehnten Veränderungen bezüglich der Erregbarkeit des neuronalen Netzwerks in den Hippokampusstrukturen führen können. Ausserdem gibt die vorliegende Arbeit weiteren Aufschluss über die Unterschiede der Kalziumstromeigenschaften, die zwischen den Hippokampusregionen CA1 und CA3 bestehen.

2. Einleitung

2.1 Der Schlaganfall

2.1.1 Klassifikation und Ätiologie

Die vorliegende Arbeit untersucht Auswirkungen von Ischämien auf das Hirngewebe. Mit seiner besonderen Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoffmangel nimmt das Gehirn eine Sonderrolle im menschlichen Körper ein. Dieser Umstand zeigt sich eindrucksvoll darin, dass das Gehirn mit nur ca. 1,75-2,5% der Körpermasse ca. 20% des Herzzeitvolumens und des Körpergrundumsatzes beansprucht.

Zerebrale Ischämien stehen an dritter Stelle der Todesursachen in den Industrienationen, wobei die Inzidenz mit der Lebenserwartung stark ansteigt. Ist im Alter zwischen 55 und 64 Jahren jeder 250ste betroffen, so ist es ab einem Alter von 65 Jahren jeder 50ste.

Zur Klassifikation der ischämischen Insulte kann man eine Einteilung nach klinischen Gesichtspunkten zur Hand nehmen (Till, 1999). Als mildeste Verlaufsform ist hierbei die transitorische ischämische Attacke (TIA) zu nennen, deren Symptome sich innerhalb von 24 Stunden wieder zurückbilden, obwohl mit bildgebenden Verfahren durchaus Läsionen des Hirngewebes nachweisbar sein können. Sie gilt als Vorbote stärkerer ischämischer Ereignisse, die sich bei ca. einem Viertel der TIA-Patienten innerhalb der nächsten 5 Jahre ereignen. Anders gesagt geht einem Drittel der zerebralen Infarkte eine TIA voraus. Als prolongiertes reversibles ischämisches neurologisches Defizit (PRIND) bezeichnet man dagegen ein ischämisches Ereignis, dessen Symptome bis zu einer Woche lang anhalten. Einen ungünstigeren Verlauf stellt der durch zunehmende Ausfälle geprägte sog. progrediente Insult dar. Der manifeste Infarkt schliesslich führt definitionsgemäss zu bleibenden Ausfällen mit oder ohne Teilremission.

Einer anderen Einteilung liegen die Ursachen von zerebralen Ischämien zugrunde, für die heute verschiedene Mechanismen bekannt sind. Die häufigste Ursache ist die Arteriosklerose der hirnversorgenden Arterien, wobei vor allem die A. carotis interna und die A. vertebralis betroffen sind, weniger häufig die A. carotis communis und der

Aortenbogen. Die akute Ischämie ereignet sich im Gefolge von Thrombenbildung an einer atherosklerotischen Plaque. Dies führt entweder zu einem Verschluss direkt vor Ort oder, nach Abriss des Thrombus, an anderer Stelle zu einer arterio-arterielle Embolie. Als Risikofaktoren sind hier die gleichen zu nennen, die bei ischämischen Herzkrankheiten diskutiert werden, mit der Besonderheit, dass der arteriellen Hypertonie bei der Genese des Schlaganfalls eine besonders grosse Rolle zugesprochen wird, da sie bei ca. 70% aller Patienten mit Hirninfarkt zu finden ist.

Als andere wichtige Ursache machen die kardial-embolischen Hirninfarkte ca. 30-40 % der Fälle aus. Vor allem durch eine absolute Arrhythmie bei Vorhofflimmern können sich Thromben aus dem linken Vorhof lösen. Hierbei spielen wiederum die ischämische Herzkrankheit und/oder die arterielle Hypertonie als häufig zugrunde liegende Mechanismen eine wichtige Rolle.

Neben den eben erwähnten makroangiopathischen Formen können auch Mikroangiopathien durch atherosklerotische Veränderungen der kleinen intrazerebralen Endarterien zu Ischämien führen.

Zu den selteneren Ursachen gehören z.B. Gefässdissektionen, Aneurysmen, Angiome, Polyzythämia und Vaskulitiden.

Der embolische oder lokal-thrombotische Verschluss von grossen Hirnarterien führt oft zu keilförmigen Territorialinfarkten im nachfolgenden Versorgungsgebiet. Dagegen kommt es beim hämodynamischen Entstehungsmechanismus typischerweise zu Grenzzoneninfarkten bzw. zu Endstrominfarkten im Gebiet der sog. „letzten Wiese“. Hierbei sind die Hirnareale betroffen, zu denen das versorgende Gefäss die längste Strecke zurückzulegen hat. Lakunäre Infarkte in Form mehrerer kleiner, verstreut liegender Läsionen resultieren typischerweise aus einer Mikroangiopathie.

Da die Durchblutungsregulation des Gehirns weitgehend unabhängig von systemischen Mechanismen funktioniert (Autoregulation), kann die Blutversorgung im Normalfall relativ konstant gehalten werden, was z.B. bei der Kreislaufzentralisation im Schock beobachtet werden kann. In den Grenzen eines

mittleren systemischen Blutdrucks von ca. 60 bis 160 mmHg funktioniert eine lokale und bedarfsgerechte Autoregulation, wobei vor allem dem vasodilatatorisch wirksamen endothelialen Stickstoffmonoxid (NO) eine grosse Bedeutung zukommt. Man unterscheidet zwischen der myogenen und der metabolischen Autoregulation:

Die myogene Autoregulation gleicht hämodynamische Veränderungen durch die glatte Muskulatur der Hirngefässe aus; man spricht auch vom Bayliss-Effekt. Nur ab mittleren Blutdruck-Werten von unter 60 mmHg droht eine pauschale Ischämie und ab Werten von über 160 mmHg ein Hirnödem. Arteriosklerose engt diesen Regulationsbereich allerdings ein, einerseits durch mechanische Alteration, andererseits durch Aktivitätsminderung der NO-Synthetase. Die arterielle Hypertonie verschiebt den Toleranzbereich hin zu höheren Werten, wodurch der Hochdruck schliesslich zu einer Bedingung für ausreichende Durchblutung wird.

Die metabolische Autoregulation beruht auf einer NO-vermittelten Vasodilatation bei einem Konzentrationsanstieg von Wasserstoffionen und Kaliumionen, sowie bei steigendem Partialdruck von Kohlendioxid und sinkendem Sauerstoff-Partialdruck. Die Gefässdilatation steigert sich bei sehr starker Stimulation bis hin zu einer Vasoparalyse, die durch steigenden Kapillardruck zu Hirnödem oder –blutung führen kann.

2.1.2 Auswirkungen

Hirnfarkte können sehr unterschiedlich ausgeprägt sein bezüglich der Intensität und des Charakters der resultierenden Ausfälle. Daher ist es auch wichtig, einige Variablen zu betrachten, die über die Folgen einer Ischämie entscheiden:

Neben Lage und Ausmass des Infarktes ist die Ausprägung kollateraler Versorgungswege von grosser Bedeutung. Wichtige Kollateralverbindungen bestehen zwischen extra- und intrakraniellen Gefässen. Der Circulus arteriosus Willisii verbindet als Schnittpunkt der intrakraniellen Anastomosen sowohl beide Hemisphären als auch das vordere und hintere Stromgebiet. Darüber hinaus bestehen zerebelläre und leptomeningeale Anastomosen.

Ebenfalls von grosser Bedeutung ist die Geschwindigkeit, mit der sich ein Gefässverschluss entwickelt, da ein langsam fortschreitender Verschluss eine Art „Training“ für die entsprechenden Kollateralgefässe darstellt, die im akuten Fall die Ausprägung eines Infarkts mildern können. Dieser Effekt fällt bei einem schlagartigen Verschluss weg, weshalb die Folgen in diesem Fall meist schwerwiegender sind.

Die von den Hirnzellen benötigte Energie wird durch die aerobe Glykolyse und den Zitronensäurezyklus bereitgestellt. Die anaerobe Glykolyse kann nur kurzfristig toleriert werden, da die Energieausbeute hierbei weit geringer ausfällt und es zu einer Anhäufung von Laktat kommt. Hält der anaerobe Zustand an, so kommt es zunächst zum reversiblen Ausfall des Funktionsstoffwechsels (Ischämieschwelle). Bei Weiterbestehen des Sauerstoffmangels kommt schliesslich auch der Strukturstoffwechsel zum Erliegen (Infarktschwelle), was mit irreversiblen Schäden gleichzusetzen ist, da das Ionenungleichgewicht der Zelle nun nicht mehr aufrecht erhalten werden kann. Um das Hirnareal herum, in dem die Infarktschwelle überschritten ist, befindet sich ein Gebiet, das zunächst nur ischämisch ist und als Penumbra bezeichnet wird (Witte et al., 2000). Hierbei ist von entscheidender Bedeutung, wie gross der Anteil der Penumbra ist, der durch andauernde Ischämie noch dem irreversibel infarzierten Kerngebiet zufällt, im Vergleich zu dem Anteil, durch baldige Reperfusion die Möglichkeit zur vollständigen Regeneration erhält. Dies für ein möglichst grosses Gebiet zu erreichen, ist das vorrangige Ziel der Akuttherapie des Schlaganfalls.

Bezüglich der Auswirkungen einer zerebralen Ischämie ist auch die unterschiedliche Empfindlichkeit der einzelnen Hirnregionen und Zelltypen gegenüber Ischämien zu berücksichtigen. Dahingehend konnte z.B. bei der Ratte gezeigt werden, dass im Falle einer Ischämie zuerst die CA1-Schicht des Hippocampus geschädigt wird, etwas später die CA3-Zellen, dann erst Gyrus dentatus und Gliazellen und zuletzt die Endothelzellen. Dieses Phänomen wird als selektive Vulnerabilität bezeichnet (Grivas et al., 2003).

Kommt es zu einer totalen Unterbrechung des Blutflusses zum Gehirn, kann man nach 6-7 Sekunden eine verminderte Neuronenentladung feststellen und nach 20 Sekunden zeigt sich bereits ein isoelektrisches EEG. Nach 5 Minuten sind

irreversible Schäden in Form von Ganglienzell-Nekrosen zu erwarten und nach 8-10 Minuten ist ein Überleben des Gehirns nicht mehr möglich.

Die hypoxische Schädigung entsteht dabei durch den intrazellulären Abfall des pH-Wertes, der die zellulären Membranen schädigt, und durch den Stillstand der Ionenpumpen, dem wiederum die ATP-Verarmung und der erniedrigte pH-Wert zugrunde liegen. Hieraus resultiert ein Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration und der extrazellulären Kaliumkonzentration, die zu einer lokalen anhaltenden Depolarisation der Neurone führt.

Weitere Schäden entstehen auch in der Reperfusionsphase, in der es zu einer Auflösung oder Verkleinerung von Thromben kommt, sei es spontan oder durch therapeutische Massnahmen. Als Ursache hierfür stehen der intrazelluläre Kalziumkonzentrationsanstieg und die Zellschwellung im Vordergrund.

Aufgrund der Hypoxie kommt es zudem zur Gefässinfiltration durch aktivierte Leukozyten, die gewebeschädigende Radikale produzieren. Dieser Mechanismus kommt in überschüssiger Reaktion besonders in der eben erwähnten Reperfusionsphase vor.

2.1.3 Therapie

In der Therapie des Hirninfarkts ist ein sofortiges Handeln erforderlich. Der Blutdruck muss im hoch-normalen Wertebereich gehalten werden. Bei vorbestehender Hypertonie und aktuellen Werten von mehr als 220 mmHg systolisch bzw. 110 mmHg diastolisch, sollte nur eine leichte Blutdrucksenkung angestrebt werden. Die Hypotonie sollte durch Gabe von Volumen oder Katecholaminen ausgeglichen werden. Eine Intensivüberwachung ist besonders bei Herzinsuffizienz, Rhythmusstörungen und Coma nötig. Nach Ausschluss eines hämorrhagischen Infarkts ist im sog. 3-Stunden-Fenster eine Thrombolyse möglich, z.B. mit Streptokinase, die mit Plasminogen aktive Komplexe bildet. Diese führen Plasminogen in Plasmin über und es kommt zur Fibrinolyse. Zum gleichen Zweck stehen auch Urokinase und tissue-type plasminogen activator (t-PA) zur Verfügung. Die Indikationsstellung muss allerdings sehr sorgfältig und unter Einbeziehung der

Kontraindikationen erfolgen, da es unter thrombolytischer Therapie zu einem signifikanten Anstieg der Zahl der intrazerebralen Blutungen kommt (Wardlaw et al., 2003). Begleitend sollten Acetylsalicylsäure und Heparin gegeben werden, um die Gefahr einer Reokklusion zu verringern.

2.2 Die Ionenkanäle der Hirnzellen

Im Gefolge von zerebralen Ischämien kommt es zu einer Reihe von Veränderungen in den Funktionsabläufen des Gehirns. Hierbei kommt den Ionenkanälen der Hirnzellen eine grosse Bedeutung zu. Daher werden in dieser Arbeit die Auswirkungen von Ischämien anhand von Veränderungen der Ionenstromeigenschaften untersucht, wobei die ionale Zusammensetzung des Gewebes und die dafür verantwortlichen Kanäle, Transporter und Pumpen eine wichtige Rolle spielen.

Die Ionenkanäle transportieren meist selektiv eine bestimmte Ionenart durch die Zellmembran. Der Öffnungszustand der Kanäle wird vom Membranpotential, von bestimmten Agonisten und anderen modulatorisch wirksamen Mechanismen bestimmt. Richtung und Rate des Ionentransports sind abhängig von der elektromotorischen Kraft (EMK) und der Leitfähigkeit (g) der Membran, was durch folgende Gleichung ausgedrückt werden kann:

$$I = g \times EMK$$

$$\text{mit } EMK = E_m - E_{ion}$$

Hierbei entspricht E_m dem Membranpotential und E_{ion} bezeichnet das Gleichgewichtspotential des betreffenden Ions.

Kommt es zu einem Einstrom von Kationen in die Zelle, so registriert man dies, per definitionem, als negativen Strom, im umgekehrten Fall als positiven Strom. Aus obiger Gleichung folgt auch, dass es bei gegebenem Membranpotential ($E_m = E_{ion}$) auch zu einer Umkehr der Stromrichtung für die jeweilige Ionensorte kommen kann. Dies gilt für Kalium-, Natrium- und Chlorid-Ionen, aber nicht für Kalziumionen. Diese nehmen eine Sonderstellung ein, da ihr Konzentrationsgefälle so extrem ist, dass die negative Kalziumstromkurve sich bei sehr hohen Membranpotentialen zwar

asymptotisch der x-Achse nähert, aber niemals positive Werte erreicht. Das hat zur Folge, dass es nie zu einem nennenswerten Ausstrom von Kalziumionen aus der Zelle kommt (Hille, 1991).

Ionenpumpen sind Membranproteine, die unter direktem ATP-Verbrauch Ionen transportieren und auf diese Weise hohe transmembranale Ionenkonzentrations-Unterschiede erzeugen können. So herrschen in der Zelle positive membrangängige Kaliumionen vor (~120 mM), aber auch negativ geladene Proteine und Phosphate, für die die Zellmembran impermeabel ist. Extrazellulär dominieren Natriumionen (~145 mM) und Chloridanionen (~117 mM). Die Konzentration von Kalziumionen ist intrazellulär extrem niedrig ($<10^{-4}$ mM), ausserhalb der Zelle findet sich jedoch eine Kalziumionenkonzentration von 1-2 mM, wodurch ein extremer Gradient zwischen dem Intra- und Extrazellulärraum entsteht.

Bei der Aufrechterhaltung dieser Ionengradienten ist besonders die elektrogene ATP-verbrauchende Natrium-Kalium-ATPase zu erwähnen, die jeweils 3 Natriumionen auf die Aussenseite der Zellmembran und 2 Kaliumionen ins Zellinnere transportiert, sowie die Kalzium-ATPase, die Kalziumionen in den Extrazellulärraum und das endoplasmatische Retikulum befördert. Von Bedeutung sind auch die Transport-Proteine, die den Natriumgradienten nutzen, um Protonen und Kalziumionen aus der Zelle heraus und Substrate in die Zelle hinein zu befördern. Auch intrazellulär gelegene Kalzium-bindende Proteine tragen einen grossen Teil dazu bei, den enormen Konzentrationsgradienten für freies Kalzium zu schaffen, der zwischen Intra- und Extrazellulärraum besteht.

2.3 Der Hippokampus bei cerebraler Ischämie

Zerebrale Infarkte haben nicht nur einen Funktionsausfall des zerstörten Areals zur Folge, sondern beeinflussen auch die Funktion weiter entfernter Hirnareale. Diese räumlich entfernten Veränderungen, die ursprünglich von von Monakow als „Diaschisis“ beschrieben wurden, können zu den Veränderungen der Hirnfunktionen beitragen, die nach einem Hirninfarkt beobachtet werden. Ausserdem können sie auf die Erholung und Wiederherstellung der Hirnfunktionen Einfluss nehmen. Aktuelle

Studien zeigen charakteristische Veränderungen in Hippokampuszellen im Gefolge einer kortikalen Läsion, wie verringerte Expression und Funktionalität von GABA_A-Rezeptoren und deren Untereinheiten (Redecker et al., 2000), sowie eine gesteigerte Neubildung von Nervenzellen, verursacht durch Ischämie (Arvidsson et al., 2001).

Ein Beispiel, an dem die weitreichenden Veränderungen der Hirnstrukturen nach einer zerebralen Ischämie gezeigt werden können, sind die Zelleigenschaften des Hippokampus. Dieser gehört zum limbischen System, welches bei Vorgängen des Lernens und des Gedächtnisses von entscheidender Bedeutung ist und bei der Entstehung affektiven Verhaltens eine wichtige Rolle spielt (Broadbent et al., 2004). Es ist beteiligt an der Kontrolle des vegetativen Nervensystems, an der Kombination von viszerale Reaktionen mit Emotion und Motivation, und an der Steuerung des neuroendokrinen Systems (Zilles, 1994). Diese Beteiligung an komplexen Regulationsmechanismen des Gehirns erklärt die starke Vernetzung des Hippokampus. Seine wichtige Funktion bei Prozessen des Lernens und der Umstrukturierung legt seine Bedeutung für die Reaktion des Gehirns auf veränderte Verhältnisse nahe, wie sie nach einem ischämischen Insult zu erwarten sind. Daher war es denkbar, dass jegliche Änderung im kortikalen Erregungsmuster, hervorgerufen durch einen Infarkt, auch die Ionenströme in den Hippokampusregionen beeinflussen könnte. In der vorliegenden Studie wurden kleine lokal begrenzte Infarkte durch eine sogenannte Photothrombose im somatosensorischen Kortex der Ratte induziert und daraufhin die Gesamt-Zell-Kalziumströme von pyramidalen Nervenzellen der Regionen CA1 und CA3 untersucht. Kalziumströme spielen eine wichtige Rolle für den Signalweg der Zelle, für die Osmose und viele Enzymkaskaden. Weiterhin sind Kalziumströme an der Entstehung epileptischer Anfälle beteiligt, welche nach Hirninfarkten beim Menschen in 5-25 % der Fälle beobachtet werden (Witte und Freund 1999) und bei 18 % der Ratten mit einer photothrombotischen Läsion (Karhunen et al., 2007). Die Korrelate der Anfälle auf zellulärer Ebene sind sog. paroxysmal depolarization shifts (PDS), die im grossen Ausmasse durch transmembranale Kalziumströme getragen werden (Witte, 1987). Aus diesen Gründen wurden Kalziumströme für die Betrachtung ausgewählt und an frisch isolierten pyramidalen Nervenzellen der Regionen CA1 und CA3 mit Hilfe der konventionellen Patch Clamp-Technik gemessen.

3. Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war es Veränderungen aufzudecken, die sich nach einem kortikalen Schlaganfall in Hirnregionen abspielen, die nicht in unmittelbarer räumlicher Verbindung zu dem von der Ischämie betroffenen Areal stehen. Zu diesem Zweck wurden die Eigenschaften von Kalziumströmen in Hippokampuszellen nach Induktion einer kortikalen ischämischen Läsion untersucht. Hierbei wurden die Stromeigenschaften der Testgruppe mit denen einer Kontrollgruppe verglichen, mit dem Ziel festzustellen, ob und wie sich ein kortikaler Infarkt im Hirn der Ratte auf Zelleigenschaften entfernter Hirnregionen auswirkt. Im Mittelpunkt des Interesses standen hierbei die Areale CA1 und CA3 des Hippokampus. Dies soll weiteren Aufschluss geben über die pathophysiologische Kaskade an Mechanismen, mit der das Gehirn auf einen Schlaganfall reagiert. Die Versuche sollen für einen Teilbereich zeigen, wie ausgedehnt die Veränderungen sind, die auf eine kortikale Ischämie folgen und wo diese lokalisiert sind.

4. Material und Methoden

4.1 Induktion der Läsion durch Photothrombose

4.1.1 Präparation

Männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht zwischen 270 und 330 g erhielten eine Narkose aus Enfluran in einem Lachgas-Sauerstoff-Gemisch von 2:1. Zunächst 3,5 % Enfluran zur Narkoseeinleitung und anschliessend 2,5 % für die weitere Dauer der Präparation. Die Rektaltemperatur wurde mit Hilfe einer beheizbaren Unterlage zwischen 36,5 und 38,0 °C konstant gehalten. Nach Rasur, Desinfektion und Bauchschnitt wurde die Femoralvene freipräpariert und ein Katheter in das Gefäss eingeführt. Der Katheter wurde mit physiologischer Kochsalzlösung angespült, womit seine Durchgängigkeit für die später folgende Injektion von Bengal-Rosa-Lösung gewährleistet werden konnte. Bei der Herstellung dieser Lösung wurden je 10 mg Bengal Rosa auf einen Milliliter 0,9 %iger Kochsalzlösung angesetzt. Die Substanz wurde immer erst am gleichen Tag hergestellt und bis zur Injektion lichtgeschützt aufbewahrt, um einen vorzeitigen Aktivitätsverlust zu vermeiden. Nach der Fixierung des Katheters wurde der Kopf des Tieres in einem stereotaktischen Rahmen fixiert und die Kopfhaut auf einer Länge von ca. 2 cm sorgfältig von der Schädelkalotte abgelöst. Die Knochenoberfläche wurde für die nachfolgende Photothrombose gesäubert und getrocknet. Anhand der Schädelnähte konnte die exakte Position für die nachfolgende Induktion der ischämischen Gewebeschädigung bestimmt werden. Auf einer Linie zwischen dem Bregma und einer Markierung 2 mm dorsal der Aufzweigung der Lambda-Naht wurde die Mitte ausgemessen. Die gesuchte Stelle wurde anschliessend 4 mm lateral von dem zuvor bestimmten Mittelpunkt auf der rechten Schädelseite markiert.

4.1.2 Induktion der Photothrombose

Ein optisches Fiberglas-Bündel mit einer Blende von 1,5 mm, das mit einer Kaltlichtquelle verbunden war, wurde auf die intakte Schädeldecke aufgesetzt. Mit Beginn der Beleuchtung, die sich über 20 min erstreckte, wurde die 1-minütige Infusion von 0,4 ml Bengal-Rosa-Lösung über den Katheter verabreicht. Die im Gefässsystem des Tieres verteilte Lösung führte exakt an der Stelle des Gehirns, das sich unter dem Lichtkegel befand, durch Radikal-Bildung zu einer Thrombose

der kleineren Blutgefäße mit nachfolgender Ischämie. Dieses Verfahren ermöglicht es, auf wenig invasive Art kleine, umschriebene Läsionen zu induzieren, die mit einem Durchmesser von ca. 2 mm gut reproduzierbar sind.

Eine andere Methode, ischämische Gewebeschädigungen hervorzurufen, ist die sog. Middle cerebral artery occlusion (MCAO), bei der ein Faden für bestimmte Zeit über die Halsschlagader des Tieres eingebracht wird. Im Gegensatz zu diesem Verfahren kommt es bei der Photothrombose, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, zu keiner Reperfusion und nur zu einer minimalen Penumbra, da die Gefäße im Bereich des Lichtkegels irreversibel thrombosiert werden, wogegen das umliegende Gewebe relativ unbeeinträchtigt bleibt. Dieser Umstand erschwert die Vergleichbarkeit der experimentell erzeugten Läsion mit dem klinisch relevanten Infarkt. Da jedoch erfahrungsgemäss die Ergebnisse der Studien mit Photothrombose und der mit MCAO weitgehend übereinstimmen, kann man von einer guten Vergleichbarkeit mit einem spontanen Infarkt ausgehen. Der Vorteil von photothrombotischen Läsionen hingegen ist ihre genauere Reproduzierbarkeit. Die Tiere der Kontrollgruppe wurden in gleicher Weise behandelt wie die der Testgruppe, nur die Beleuchtung unterblieb und es kam somit zu keiner Photothrombose.

4.2 Durchführung der Untersuchungen

4.2.1 Isolierung der Neurone

Die Charakterisierung der Kalziumströme fand jeweils 7 Tage nach Induktion der Läsion statt. Die mit Enfluran tief anästhesierten Tiere wurden dekapitiert, das Kopffell wurde mit einem Skalpells in sagittaler Schnittführung durchtrennt und die Temporalmuskulatur eingeschnitten, um ein möglichst schonendes Eröffnen des Schädels zu ermöglichen. Am Foramen magnum wurde eine Pinzette angesetzt, wodurch die Okzipitalschuppe entfernt werden konnte. Das Schädeldach wurde nun mit der Pinzette beidseits von okzipital her abgehoben und die Dura mater mittels Mikroschere und Mikropinzette vorsichtig von der Hirnoberfläche entfernt. Mit einem gebogenen Spatel konnte das Gehirn aus der Schädelgrube gehoben werden, wobei Gefäss- und Nervenstränge an der Hirnbasis durchtrennt wurden. Für 1,5 min wurde das Gehirn zunächst in sog. künstlicher zerebrospinaler Flüssigkeit (ACSF) gekühlt

(ca. 4 °C) und mit einem Gemisch aus 95 % O₂ und 5 % CO₂ begast. Die Präparation nahm 2 – 2,5 min in Anspruch. Die Zusammensetzung der ACSF, die auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt wurde, betrug in mM/l: 124 NaCl; 3 KCl; 1,25 NaH₂PO₄; 2 CaCl₂; 2 MgSO₄ und 10 Glukose. Die Hemisphären wurden mit einer Rasierklinge getrennt und der frontale und okzipitale Hirnanteil wurden en bloc entfernt. Der verbleibende Gewebeblock wurde an seiner dorsalen Seite mit Histoacryl-Gewebeklebstoff am Boden einer Vibratomschale fixiert. Mit einem Vibratom (Leica VT 1000S) wurden koronare Schnitte von 400 µm Stärke angefertigt, welche ständig in gekühlter ACSF aufbewahrt wurden. Die zu untersuchenden Hippokampusregionen CA1 bzw. CA3 wurden mit Hilfe eines Anatomie-Atlanten über das Gehirn der Ratte von Paxinos und Watson identifiziert und mit einem Skalpell so knapp herausgetrennt, dass das Vorhandensein von Neuronen anderer Regionen in der Gewebeprobe ausgeschlossen werden konnte. Die so erhaltenen Gewebeteile wurden in sog. Dissoziationslösung mit 1 mg Trypsin pro Milliliter 55 Minuten lang bei einem pH-Wert von 7,0 und einer Temperatur von 32 °C inkubiert. Die Zusammensetzung der Dissoziationslösung betrug in mM/l: 120 NaCl; 1 CaCl₂; 2 KCl; 2 MgCl₂; 20 PIPES und 25 Glukose.

Die Gewebeproben von ca. einem Millimeter Länge und Breite wurden anschliessend mit trypsinfreier Dissoziationslösung mehrmals gewaschen und im Weiteren bei 19 °C in dieser Lösung aufbewahrt. Wenige Minuten vor der Messung wurde jeweils ein Gewebestück in sog. extrazellulärer Lösung verbracht und zerkleinert. Hierbei wurde das Material durch Pipettenöffnungen mit abnehmenden Durchmessers tituiert. Dadurch wurde der Zellverband soweit aufgelöst, dass einzelne Nervenzellen isoliert werden konnten, die Integrität der Zellmembranen dabei aber erhalten blieb. Die Lösung und die darin enthaltenen Zellen wurden dann unter dem Mikroskop betrachtet. Die Zusammensetzung der extrazellulären Lösung mit einem pH-Wert von 7,4 betrug in mM/l: 2,5 CaCl₂; 5 KCl; 1 MgCl₂; 110 NaCl; 25 TEA; 5 4-AP; 10 HEPES; 0,001 TTX; 25 Glukose. Der spannungsabhängige Natriumstrom durch die Zellmembran wurde durch Tetrodotoxin (TTX), das Toxin des japanischen Kugelfisches, selektiv blockiert. Tetraäthylammonium (TEA) und 4-Aminopyridin (4-AP) wurden zur Blockade der Kaliumströme verwendet. Während der Messung wurden die Zellen über einen mit dem Bad verbundenen Pumpmechanismus ständig von frischer extrazellulärer Lösung umspült.

4.2.2 Versuchsaufbau

In der vorliegenden Arbeit wurde die Voltage-Clamp-Technik benutzt, die zu den Patch-Clamp-Verfahren gehört. Die Messung erfolgt über eine Mikroelektrode (Patch-Pipette), bestehend aus einem unter Hitze ausgezogenen Borsilikatglasröhrchen. Mit Hilfe eines sog. Pullers (Brown-Fleming P87) können aus einem Röhrchen zwei Elektroden gewonnen werden. Die Pipetten sind mit leitender, intrazellulärer Flüssigkeit gefüllt und erhalten ihren elektrischen Kontakt zum restlichen System über einen chlorierten Silberdraht. Durch einen kleinen Schlauch, der in den Pipettenhalter mündet, kann an die Elektrode ein Unterdruck angelegt werden, mit dessen Hilfe einzelne Zellen angesaugt werden können. Der Pipettenhalter ist über einen Mikromanipulator elektrisch ansteuerbar, so dass die Elektrode auch auf kleinstem Raum exakt bewegt werden kann. Nach dem Eintauchen der Pipette in die geerdete Badlösung wird bei einer Spannung von 0 mV zunächst der Offsetstrom am Verstärker eliminiert, der ansonsten eine Fehlspannung über den Elektroden bzw. Zellwiderstand induzieren würde. Diese Fehlspannung wird nach der Messung noch einmal kontrolliert, nachdem die Zelle durch Überdruck von der Pipette entfernt worden ist, und lag in der vorliegenden Arbeit durchweg unter ± 2 mV. Die gepulsten Potentialsprünge nach -5 mV und $+5$ mV, die nun an der Elektrode angelegt werden, lassen einen Rechteckstrom entstehen, aus dem der Widerstand an der Pipette (R_{pip}) errechnet werden kann. Nun wird die Badlösung unter dem Mikroskop nach Zellen mit geeigneten morphologischen Kriterien durchsucht. In der vorliegenden Arbeit wurde nach pyramidalen Neuronen mittlerer Grösse gesucht, die einen intakten Zellkörper und einen deutlichen Zellwandreflex aufwiesen. Eine entsprechende Zelle wurde vorsichtig an die Pipettenöffnung angesaugt, wodurch eine stabile Verbindung entstand, deren Widerstand im Bereich mehrerer Gigaohm lag („Gigaseal“). „Leckströme“, die zwischen Pipette und Zellmembran ins Bad fliessen, können durch diesen hohen Abdichtwiderstand minimiert werden. Sie würden im Rahmen eines systemischen Fehlers zu hohe Stromwerte ergeben. In dem soeben beschriebenen Cell-attached-Modus minimiert sich die Stromanzeige durch den hohen Widerstand bis auf kleine kapazitative Artefakte an Anfang und Ende des Spannungspulses, die durch das Umladen der Pipettenkapazität entstehen und am Verstärker kompensiert werden können (siehe Abb.1).

In der vorliegenden Arbeit wurde die sogenannte Whole-Cell-Konfiguration oder Ganzzelleableitung benutzt. Hierbei wird nicht nur der Bereich unter der Pipettenöffnung, sondern die gesamte Zellmembran erfasst. Dafür wird die Membran, die bereits durch einen Seal mit der Pipette verbunden ist, mittels Erhöhung des Unterdrucks durchbrochen. Ab diesem Zeitpunkt misst man den Strom, der durch die gesamte verbleibende Membranfläche fließt. Da sich das verhältnismässig geringe Zytoplasma-Volumen schnell mit der Pipettenlösung austauscht, kann man davon ausgehen, dass zum Zeitpunkt der Messung das Zellinnere annähernd die Zusammensetzung der Pipettenlösung aufweist (siehe Abb.1).

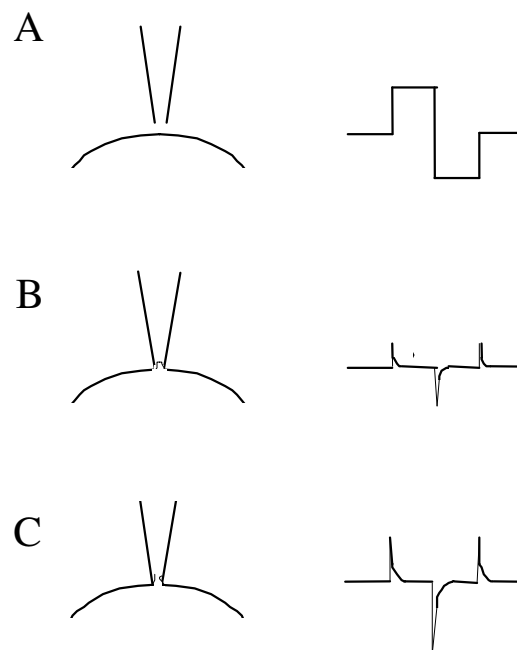


Abb. 1. Messkonfigurationen der Patch-Clamp-Technik und ihre Korrelate bei der Strommessung.

A: Pipette in Badlösung ohne Kontakt zur Zelle

B: Cell-attached-Modus

C: Whole-Cell-Konfiguration

Vor dem Durchbrechen der Zellmembran wird ein negatives Haltepotential von -80 mV eingestellt, das in etwa dem Ruhemembranpotential der Zelle entspricht. Die Zellmembran besitzt einen elektrischen Widerstand R_m , der umgekehrt proportional zur Leitfähigkeit der Zelle ist, und eine Kapazität C_m , die proportional zur Zelloberfläche ist (siehe Abb.2).

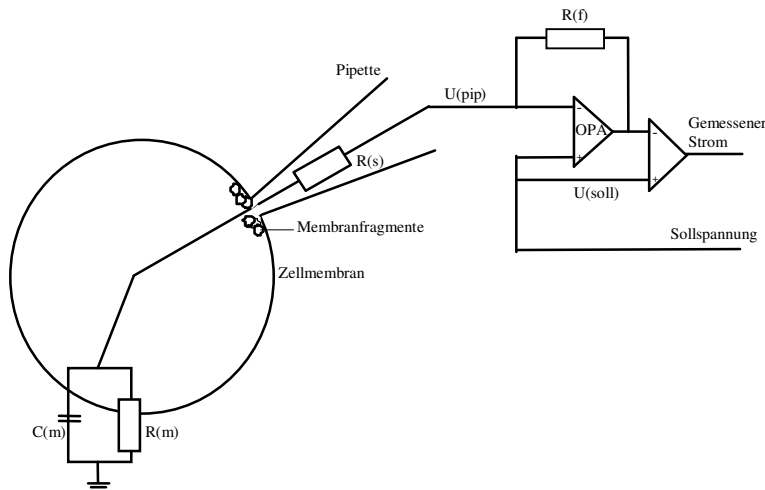


Abb. 2: Schaltbild einer Zelle in der Whole-Cell-Konfiguration und eines Patch-Clamp-Verstärkers (vereinfacht). C_m : Membrankapazität, R_m : Membranwiderstand, R_s : Serienwiderstand, U_{pip} : Pipettenpotential, U_{soll} : Sollspannung, OPA: Operationsverstärker, R_f : Rückkopplungswiderstand.

Zwischen dem Silberdraht, der Pipette und dem Zellsoma existiert ein Serienwiderstand R_s , der idealerweise genau dem Pipettenwiderstand R_{pip} entsprechen sollte. In Wirklichkeit ist R_s jedoch höher als R_{pip} , da z.B. Membranbestandteile vor der Pipettenöffnung den Widerstand erhöhen. Beim Auslösen eines Potentialsprungs muss zunächst der Kondensator C_m umgeladen werden, bevor die neue Spannung zwischen Soma und Bad anliegt. Die daraus resultierenden kapazitiven Ströme können jedoch am Verstärker kompensiert werden. Nach der Korrektur erhält man ein fast glattes Signal. Beim Umladen der Membrankapazität wird vorübergehend Strom in die Zelle injiziert. Die Geschwindigkeit dieses Vorgangs ist abhängig vom Serienwiderstand R_s . Je kleiner R_s ist, desto schneller liegt nach einem Potentialsprung die gewünschte Spannung an der Zelle an. Wird also R_s im Verhältnis zu R_m möglichst klein gehalten, entspricht der gemessene Strom am genauesten der Leitfähigkeitsänderung der Membran. Sobald der Umladeprozess abgeschlossen ist, fließt der Erhaltungsstrom, der das

eingestellte Sollpotential aufrechterhält. Die Widerstände R_m und R_s bilden zusammen einen sog. Spannungsteiler, bei dem ein Teil der Kommandospannung an R_s abfällt. Somit liegt im Zellinnern eine geringere Spannung an, als es die Sollspannung angibt. Dieser Spannungsverlust kann mit Hilfe des Verstärkers kompensiert und somit eliminiert werden. Typischerweise können so mehr als 90 % des Spannungsverlustes vermieden werden. Während des Experiments misst der Patch-Clamp-Verstärker das an der Zellmembran anliegende Potential und injiziert zeitgleich die entsprechende Strommenge in die Zelle, die nötig ist, um das eingestellte Sollpotential aufrecht zu erhalten (Numberger und Draguhn 1996). Über diesen sog. Kompensationsstrom ist es nun möglich, die Ströme, die durch die Zellmembran fließen, darzustellen (siehe Abb.3).

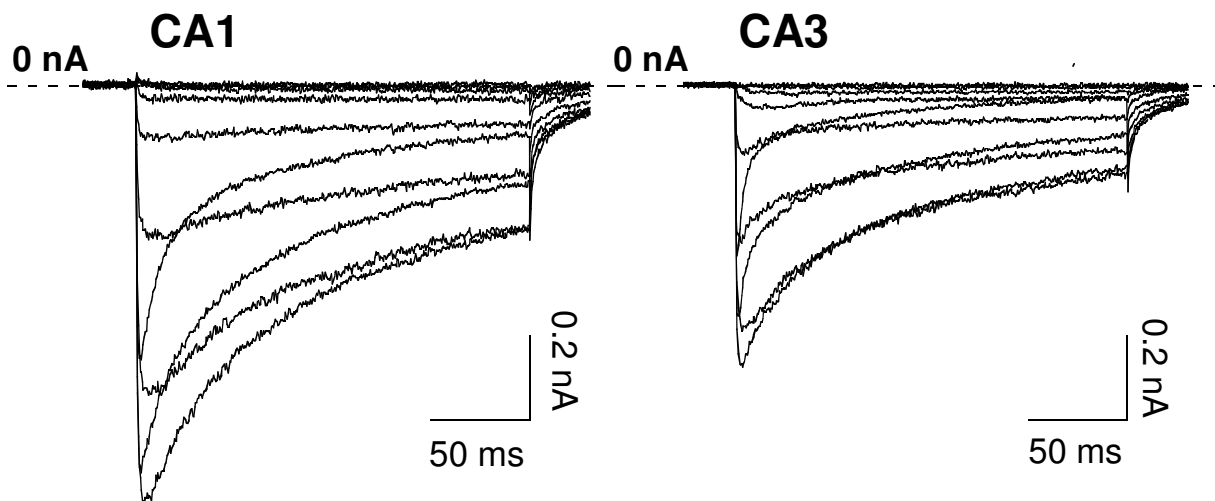


Abb. 3. Ganzzell-Kalziumströme ausgelöst in frisch isolierten Neuronen der Hippokampusregionen CA1 (links) und CA3 (rechts) von Kontrolltieren. Die Ströme wurden ausgelöst durch Potentialsprünge von -80 mV (Haltepotential) auf Spannungen im Bereich von -70 bis +40 mV (Steigerungsrate: 10 mV). Die maximalen Amplituden der Kalziumströme aus der CA3-Region waren signifikant kleiner als die aus der CA1-Region.

4.2.3 Versuchsablauf

Für die Messungen mit der Gesamtzellableitung wurden Pipetten von 2–4 M Ω Widerstand verwendet, die mit sogenannter intrazellulärer Lösung gefüllt waren. Diese Lösung besass einen pH-Wert von 7,3, enthielt 50 Units CP-Kinase pro Milliliter und bestand im Übrigen aus folgenden Komponenten in mM/l: 0,5 CaCl₂; 100 CsF; 2 MgCl₂; 20 TEA, 10 HEPES; 10 EGTA; 20 p-Kreatin; 2 Mg-ATP; 0,1 Na-GTP und 0,1 Leupeptin. In der vorliegenden Arbeit wurden Kalzium-Ströme vom high-voltage activated-Typ (HVA) gemessen, die im Gegensatz zu den low-voltage activated-Strömen (LVA-Typ) erst bei einem Potentialsprung auf ca. -35 mV ausgelöst werden können. Die Kalziumströme vom LVA-Typ können dagegen bereits bei einem Potentialsprung auf -60 mV beobachtet werden. Die Stromspuren wurden mit einem Axopatch 200B Verstärker aufgezeichnet, mit einer Grenzfrequenz von 2 kHz tiefpass-gefiltert, und mit Hilfe des „Neuron“-Programms von W.J. Wadman auf einem Atari TT Computer mit 2 kHz sample-Frequenz gespeichert. Der Kapazitätsausgleich fand während der Messung statt und die restlichen Leckströme wurden bei allen Stromspuren nach der Messung eliminiert. Die Leckströme fallen über einen ohmschen Widerstand ab und verlaufen durch den Ursprung des entsprechenden Diagramms. Sie wurden mit Hilfe der Stromantwort errechnet, die auf die Potentialsprünge um -5 mV und +5 mV vom Haltepotential (80 mV) aus erfolgte, da bei diesen Spannungen nicht mit der Auslösung eines Kalziumstroms zu rechnen ist. Die auf diese Weise bestimmten Leckströme wurden im Anschluss an die Messungen von den einzelnen Stromspuren subtrahiert.

4.2.4 Statistik

Die Messergebnisse wurden für die quantitative Auswertung als Mittelwerte \pm Standardfehler der Mittelwerte (SEM) angegeben. Als statistisch signifikant wurden Mittelwerte bezeichnet, die einen p-Wert von <0.05 erreichten. Die Rohdaten wurden mit Hilfe eines Makroprogramms auf dem Atari-Computer ausgewertet und zur Interpretation der Ergebnisse in eine Excel-Tabelle überführt. Die Gegenüberstellung der Messergebnisse von Test- und Kontrollgruppe erfolgte arealspezifisch.

Ein wichtiges Kriterium zur Charakterisierung des HVA-Stroms sind seine sogenannten Aktivierungseigenschaften. Zum Auslösen des Stroms wurden, ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV , für jeweils 200 Millisekunden Potentialsprünge vorgegeben, die, beginnend bei -70 mV , um jeweils 10 mV gesteigert wurden bis zu einem Höchstwert von $+40\text{ mV}$. Das Intervall zwischen den einzelnen Potentialsprüngen betrug jeweils 10 s (für Details siehe folgende Referenzen: (siehe Abb.4)).

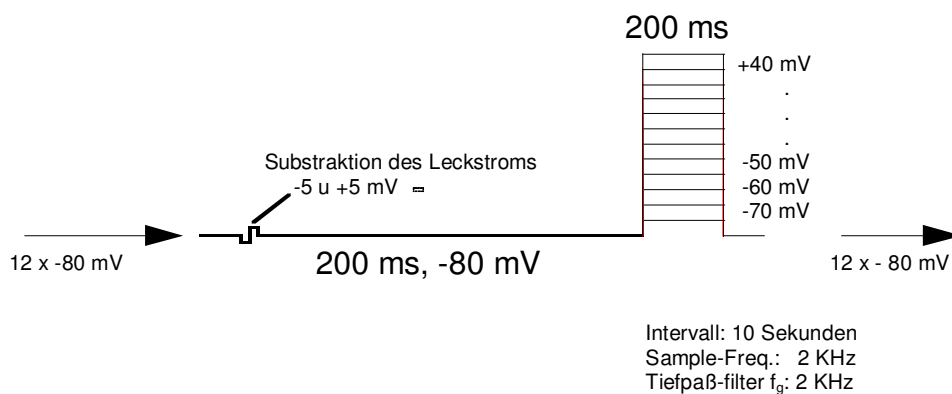


Abb.4: Versuchsablauf nach dem Aktivierungsprotokoll. Die Spannungswerte geben die Potentiale an, die zum jeweiligen Zeitpunkt an die Zelle angelegt wurden.

Die maximalen Stromamplituden können in Abhängigkeit von dem Potential, bei dem der jeweilige Strom ausgelöst wurde, in Form einer Strom-Spannungs-Kurve (IV-Kurve) dargestellt werden. Die mittlere Spitzenamplitude der Ströme betrug $-1,1 \pm 0,1$ nA ($n = 22$) bei der Kontroll-Gruppe ($_{\text{con}}$) und $-0,9 \pm 0,1$ nA ($n = 24$) bei der Test-Gruppe ($_{\text{ies}}$) der CA1 Zellen. Entsprechend wurden für die Neurone der CA3-Region die Werte $-0,6 \pm 0,1$ nA ($n = 23$) bzw. $-0,7 \pm 0,1$ nA ($n = 27$) ermittelt, was keine signifikanten Unterschiede für beide Zell-Typen ergab (siehe Abb.5).

Im Vergleich der Amplituden von CA1 und CA3 trat allerdings ein deutlich signifikanter Unterschied zutage, der wohl auf die verschiedenen Anteile der Kalziumkanal-Typen in den beiden Regionen zurückzuführen ist.

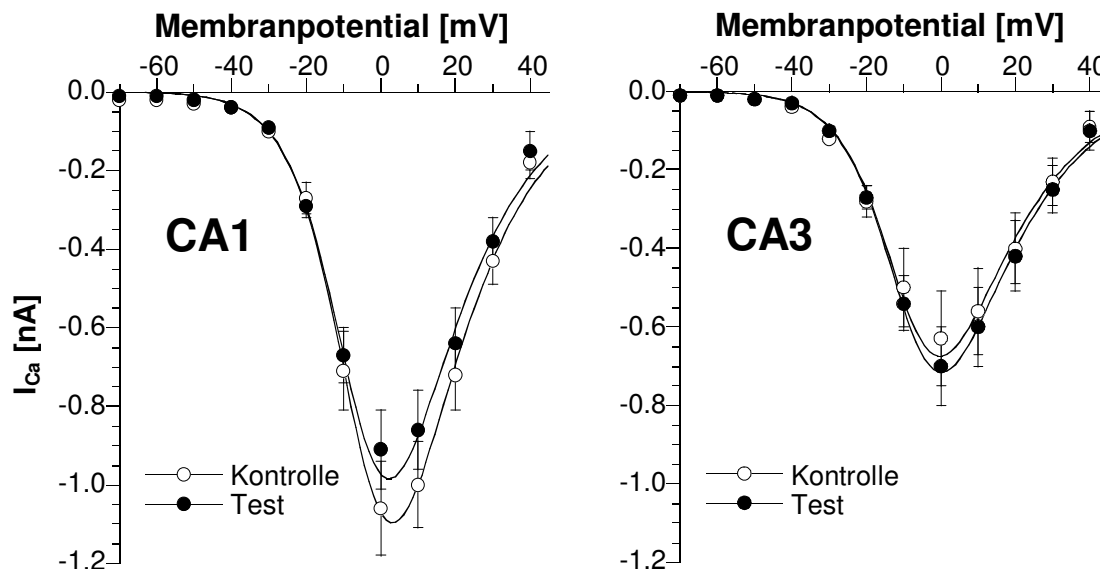


Abb.5: Strom-Spannungs-Beziehung (IV-Kurve) der Kalziumströme aus der CA1 und CA3-Region. Beim Vergleich der IV-Kurven der Kontrollgruppe (leere Kreise) mit der der Testgruppe (schwarze Kreise) der jeweiligen Hippokampusregion konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Die IV-Kurven konnten mit Hilfe einer Kombination aus der Boltzmann Aktivierungsfunktion und der Goldman-Hodgkin-Katz Strom-Gleichung als sogenannte fit-Funktionen dargestellt werden (Hille, 1991):

$$I(V) = V \times g_{\max} \times \underbrace{\frac{1}{1 + \exp\left(\frac{V_{h,a} - V}{V_c}\right)}}_{\text{Boltzmann-Term}} \times \underbrace{\frac{[Ca^{++}]_{in} / [Ca^{++}]_{out} - \exp(-\alpha V)}{1 - \exp(-\alpha V)}}_{\text{GHK-Term}}$$

mit $\alpha = F/RT$, R = Gaskonstante, T = absolute Temperatur, V = Membranpotential, $[Ca^{++}]$ = Kalziumkonzentration.

Die Gleichung lieferte die drei folgenden Parameter: das Potential der halbmaximalen Aktivierung ($V_{h,a}$), die maximale Kalziumleitfähigkeit (g_{max}) und die Steigung der Boltzmann-Funktion an dem Punkt $V_{h,a}$ ($V_{c,a}$). Das Potential der halbmaximalen Aktivierung entspricht dabei dem Spannungswert, bei dem sich statistisch die Hälfte der spannungsabhängigen Kalziumkanäle im „offen-Zustand“ befindet. Bei diesen Aktivierungseigenschaften konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen beobachtet werden, wogegen sich wiederum deutliche Abweichungen zwischen den Hirnregionen CA1 und CA3 ergaben. Die Werte im Einzelnen: für die Maximale Kalziumleitfähigkeit CA1_{con} gegen CA1_{les}: $140,7 \pm 17,8$ nS ($n = 22$) gegen $126,6 \pm 20,4$ nS ($n = 24$); CA3_{con} gegen CA3_{les}: $78,9 \pm 17,0$ nS ($n = 23$) gegen $83,6 \pm 12,4$ nS ($n = 27$). Auch bei den Potentialen der halbmaximalen Aktivierung ($V_{h,a}$) zeigte sich eine weitgehende Übereinstimmung: CA1_{con} gegen CA1_{les}: $-4,1 \pm 1,1$ mV ($n = 22$) gegen $-5,1 \pm 1,2$ mV ($n = 24$); CA3_{con} gegen CA3_{les}: $-7,0 \pm 1,2$ mV ($n = 23$) gegen $-6,8 \pm 1,1$ mV ($n = 27$). Ähnliches gilt für die Steigung $V_{c,a}$ am Punkt $V_{h,a}$: CA1_{con} gegen CA1_{les}: $-6,6 \pm 0,2$ ($n = 22$) gegen $-7,0 \pm 0,2$ ($n = 24$); CA3_{con} gegen CA3_{les}: $-8,1 \pm 0,4$ ($n = 23$) gegen $-7,5 \pm 0,3$ ($n = 27$).

5.2 Spannungsabhängige Inaktivierung

Die steady state Inaktivierung, oder auch Gleichgewichtsinaktivierung, des HVA-Stroms der Zellen wurde bestimmt, indem die Neurone für jeweils 3 Sekunden bei bestimmten Vorpotentialen gehalten wurden, die in 15 mV-Schritten von -105 bis auf 0 mV variiert wurden. In Abhängigkeit von den unterschiedlichen Vorpotentialen wurden die Zellen teilweise inaktiviert. Auf dieses Intervall folgte ein Testsprung auf +10 mV für 100 ms (für Details siehe folgende Referenzen: (Bruehl und Wadman 1999; Bruehl et al., 2000c; Bruehl et al., 2000b) (siehe Abb.7).

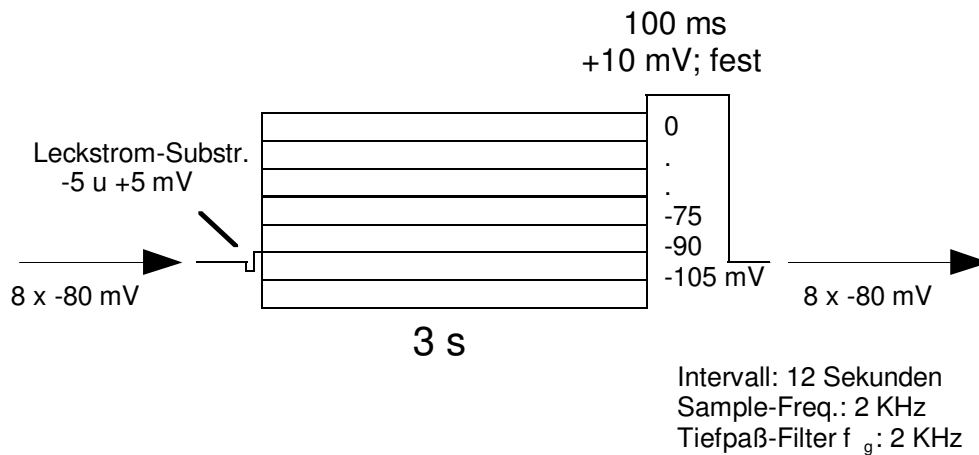


Abb.7: Versuchsablauf nach dem Protokoll der spannungsabhängigen Inaktivierung. Die Spannungswerte geben die Potentiale an, die zum jeweiligen Zeitpunkt an die Zelle angelegt wurden.

Die Amplituden der ausgelösten Ströme wurden auf die maximale Amplitude normiert und gegen das jeweilige Vorpotential aufgetragen. Die resultierende Kurve wurde als sog. Boltzmann-fit-Funktion dargestellt (Hille, 1991):

$$N(V) = \frac{I(V)}{I_{\max}} \quad \text{mit} \quad I(V) = \frac{I_{\max}}{1 + \exp\left(\frac{V_{h,i} - V}{V_{c,i}}\right)}$$

Mit dieser Gleichung konnte das Potential der halbmaximalen Inaktivierung $V_{h,i}$ und die Steigung an diesem Punkt, genannt $V_{c,i}$, ermittelt werden. Hierbei entspricht das Potential der halbmaximalen Inaktivierung dem Spannungswert, bei dem statistisch die Hälfte der spannungsabhängigen Kalziumkanäle inaktiviert ist. Ein signifikanter Unterschied war zwischen den Zellgruppen der CA1 Region erkennbar, wobei das $V_{h,i}$ der Neurone aus der Testgruppe ($-36,6 \pm 1,5 \text{ mV}$; $n = 23$) um $5,8 \text{ mV}$ negativer ausfiel als das $V_{h,i}$ der Kontrollgruppe ($-30,8 \pm 1,6 \text{ mV}$; $p < 0,01$; $n = 20$).

Das Potential der halbmaximalen Inaktivierung der CA3-Neurone variierte ebenfalls signifikant zwischen der Kontrollgruppe ($-39,8 \pm 1,6 \text{ mV}$; $n = 23$) und der Testgruppe ($-34,8 \pm 1,4 \text{ mV}$; $p < 0,05$; $n = 27$). Aber in diesem Fall fiel das $V_{h,i}$ der Testgruppe um $5,0 \text{ mV}$ positiver aus als das der Kontrollgruppe (siehe Abb.8).

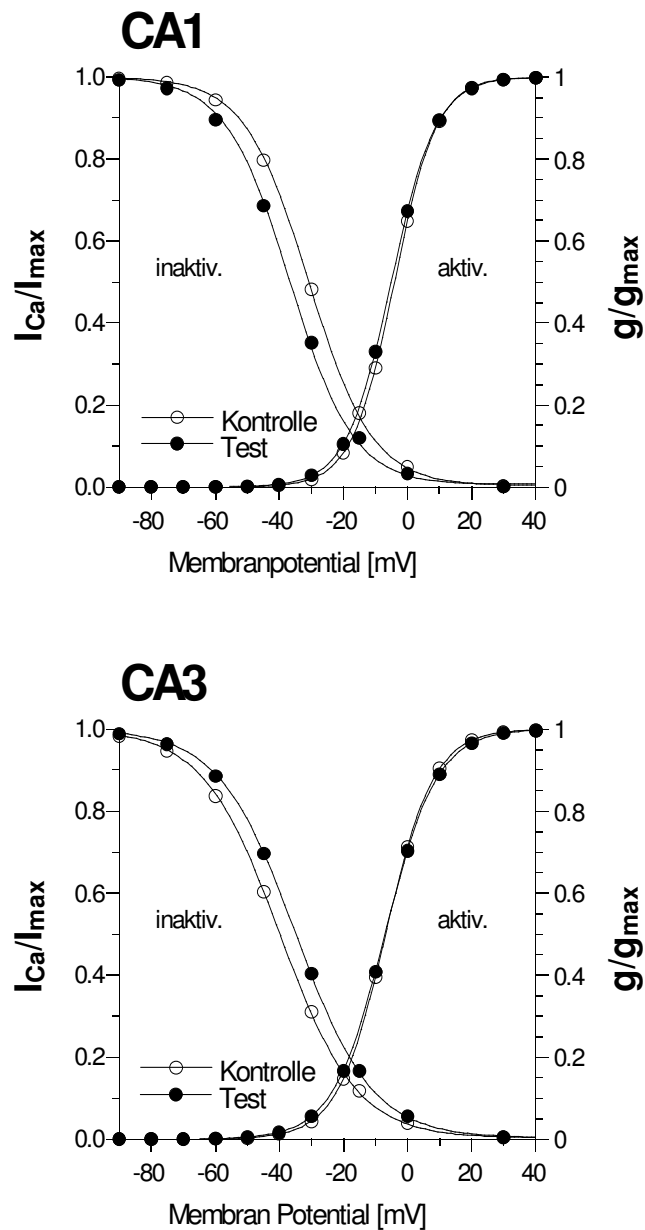


Abb.8: Boltzmann-Kurve der Aktivierung („aktiv“) und der Inaktivierung („inaktiv“). In beiden Hippokampusregionen unterschied sich das halbmaximale Potential der Aktivierung ($V_{h,a}$) in der Kontrollgruppe nicht von dem in der Testgruppe. Dagegen konnte eine signifikante Negativ-Verschiebung der Inaktivierungs-Boltzmann-Kurve in der Testgruppe (schwarze Kreise) gegenüber der Kontrollgruppe (weisse Kreise) der CA1-Region beobachtet werden. Bei den CA3-Neuronen kam es im Vergleich der Testgruppe mit der Kontrollgruppe zu einer Verschiebung der Boltzmann-Kurve in die entgegengesetzte (positive) Richtung.

Im Gegensatz hierzu stellten sich bei der Steigung der Boltzmann-Inaktivierungskurve am Punkt $V_{h,i}$ keine derartigen Veränderungen ein: CA1_{con} gegen

CA1_{les}: $10,4 \pm 0,8$ mV gegen $10,8 \pm 0,4$ mV und CA3_{con} gegen CA3_{les}: $12,3 \pm 0,5$ mV gegen $12,3 \pm 0,5$ mV. Beim Vergleich der areal-spezifischen Parameter der Hirnregionen CA1 und CA3 war durchweg, ähnlich wie bei den Parametern für die Aktivierung, ein signifikanter Unterschied zu beobachten. Die Gegensätzlichkeit der Werteververschiebung in den beiden Testgruppen wird durch Abb. 9 verdeutlicht.

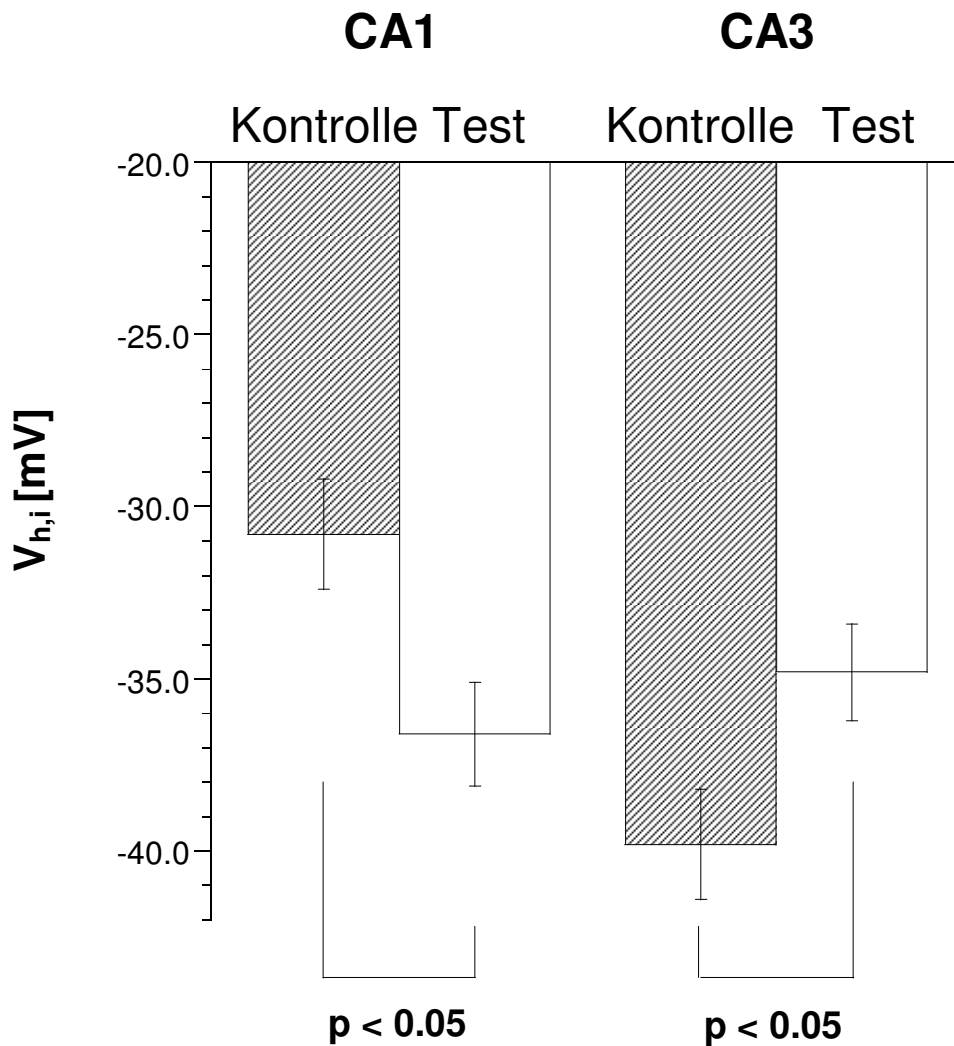


Abb.9: Das Potential der halbmaximalen Inaktivierung ($V_{h,i}$) der Kontrolltiere (weisse Balken) und der Testtiere (gestreifte Balken) im Vergleich der Regionen CA1 und CA3. CA1-Neurone zeigten eine signifikante ($P < 0,05$) Negativ-Verschiebung des $V_{h,i}$ nach kortikaler Photothrombose. Eine deutliche und signifikante Positiv-Verschiebung ($P < 0,05$) zeichnete sich bei den Neuronen der Testgruppe in der CA3-Region ab.

5.3 Zeitabhängige Inaktivierung

Zusätzlich wurde die Zeit bestimmt, die nötig ist, um die Inaktivierung, ausgelöst durch einen Sprung auf 0 mV für 3000 ms, wieder aufzuheben, was im angelsächsischen Sprachgebrauch mit „Removal of inactivation“ umschrieben wird. Dafür wurden den Zellen bei einem Potential von -100 mV Erholungszeiten unterschiedlicher Länge, zwischen 10 und 5000 ms, erlaubt. Die Auswirkung der verschiedenen Erholungszeiten konnte im Anschluss durch einen Sprung auf 0 mV für 100 ms gezeigt werden. Zwischen den einzelnen Testdurchläufen wurden Pausen von je 30 s eingehalten, in denen die EGTA-Pufferung eine Erhöhung des intrazellulären Kalziums während der langen Depolarisationsphasen abfangen konnte (siehe Abb.10).

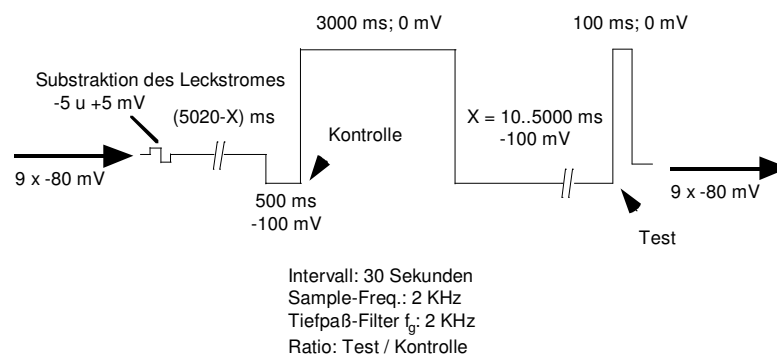


Abb.10: Versuchsablauf nach dem Protokoll der zeitabhängigen Inaktivierung. Die Spannungswerte geben die Potentiale an, die zum jeweiligen Zeitpunkt an die Zelle angelegt wurden.

Zu Beginn jeder Inaktivierungsphase wurde durch den Potentialsprung auf 0 mV ein Strom ausgelöst. Mit den Amplituden dieses Stroms wurden die jeweils auf die Inaktivierungsphase folgenden Testströme normiert und gegen die Erholungszeit aufgetragen. Dies führte zu einer Erholungsfunktion, die als biexponentielle fit-Funktion beschrieben werden konnte. Die resultierenden Zeitkonstanten τ_{fast} und τ_{slow} zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden getesteten Gruppen. Für die Neurone der CA1-Region betrug τ_{fast} 169 ± 51 ms ($n = 21$) in der Kontrollgruppe und 151 ± 55 ms ($n = 21$) in der Testgruppe, während τ_{slow} 2726 ± 897 ms (Kontrollgruppe) bzw. 1513 ± 209 ms (Testgruppe) betrug. Ähnliches wurde bei der Untersuchung der CA3-Zellen beobachtet. Die Werte von τ_{fast} ergaben $91 \pm 7,9$ ms ($n = 18$) bei der Kontrollgruppe und 101 ± 12 ms ($n = 25$) bei der

Testgruppe. τ_{slow} betrug 1429 ± 83 ms für die Kontrollzellen und 1414 ± 102 ms für die Zellen der Testgruppe (siehe Abb.11).

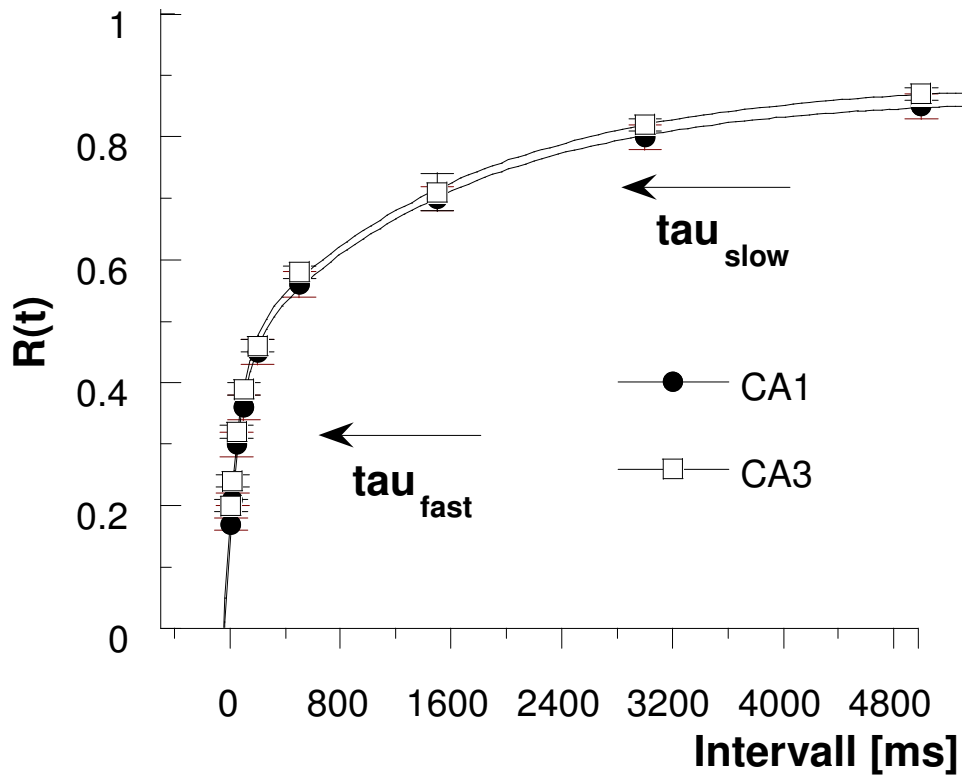


Abb.11: Erholungsfunktion der zeitabhängigen Inaktivierung mit den Zeitkonstanten τ_{fast} und τ_{slow} .

Wie schon bei der Aktivierung und der spannungsabhängigen Inaktivierung unterschieden sich auch bei der zeitabhängigen Inaktivierung die Ergebnisse der CA1-Zellen signifikant von denen der CA3-Zellen.

5.4 Vergleich der Regionen CA1 und CA3

In den vorangegangenen Abschnitten des Ergebnisteils wurde bereits mehrfach auf die Unterschiede der CA1- und CA3-Neurone hingewiesen. Beim Vergleich der beiden Regionen unterschieden sich in der vorliegenden Studie die Kontrollgruppen im einzelnen in den folgenden Messwerten: mittlere Spitzenamplitude: $-1,1 \pm 0,1$ nA (CA1) gegen $-0,6 \pm 0,1$ nA (CA3); maximale Kalziumleitfähigkeit: $140,7 \pm 17,8$ nS (CA1) gegen $78,9 \pm 17,0$ nS (CA3); Potential der halbmaximalen Aktivierung $V_{h,a}$: $-4,1 \pm 1,1$ mV (CA1) gegen $-7,0 \pm 1,2$ mV (CA3); Steigung $V_{c,a}$ am Punkt $V_{h,a}$: $-6,6 \pm 0,2$ (CA1) gegen $-8,1 \pm 0,4$ (CA3); Potential der halbmaximalen Inaktivierung $V_{h,i}$: $-30,8 \pm 1,6$ mV (CA1) gegen $-39,8 \pm 1,6$ mV (CA3); Steigung $V_{c,i}$ am Punkt $V_{h,i}$: $10,4 \pm 0,8$ mV (CA1) gegen $12,3 \pm 0,5$ mV (CA3); Zeitkonstante der Removal of Inactivation τ_{fast} : 169 ± 51 ms (CA1) gegen $91 \pm 7,9$ ms (CA3) und τ_{slow} : 2726 ± 897 ms (CA1) gegen 1429 ± 83 ms (CA3).

6. Diskussion

In der vorliegenden Studie wurden Infarkte im Neokortex der Ratte induziert und anschliessend die Kalziumstromeigenschaften von Hippokampusneuronen untersucht. Der durch Photothrombose verursachte kortikale Infarkt bewirkte eine signifikante Änderung der Spannungsabhängigkeit der Kalziumstrominaktivierung: Das Potential der halbmaximalen Inaktivierung ($V_{h,i}$) wurde bei Neuronen der CA1-Region weiter in den negativen Bereich verschoben, während es bei CA3-Neuronen zu einer Verschiebung in Richtung weniger negativer Werte kam (siehe Abb.9). Hierbei blieb die Steigung der Boltzmann-Kurve der Inaktivierung ($V_{c,i}$) am Punkt $V_{h,i}$ unverändert für beide Zellgruppen. Bei allen anderen untersuchten Kalziumstromeigenschaften konnte keine Werteververschiebung beobachtet werden. Die entgegengesetzten Veränderungen des $V_{h,i}$ in den beiden Regionen deuten auf unterschiedliche Mechanismen hin, die hier für die Erregbarkeit der Neurone verantwortlich sind. Die Verschiebung der $V_{h,i}$ -Werte in den CA1-Neuronen hin zu negativeren Potentialen dürfte die Erregbarkeit dieser Neurone herabsetzen, da dies eine grössere Anzahl inaktivierter Kalziumkanäle bei dem entsprechenden Membranpotential bedeutet. Im Gegensatz dazu dürften die Nervenzellen der CA3-Region leichter erregbar sein. Die gegenläufigen Veränderungen in diesen Hippokampusregionen könnten durch unterschiedliche Zelleigenschaften der Neurone in den beiden untersuchten Regionen zustande kommen. Es ist bekannt, dass der HVA-Strom aus mindestens zwei Subtypen besteht, dem N- und dem L-Typ. Während der N-Typ durch schnelle Aktivierung gekennzeichnet ist und bereits bei sehr niedrigen Spannungswerten sein Potential der halbmaximalen Inaktivierung aufweist, charakterisiert sich der L-Typ durch langsamere Aktivierung. Er lässt sich zudem schwerer inaktivieren, weshalb sein Potential der halbmaximalen Inaktivierung bei deutlich höheren Spannungswerten angesiedelt ist. Die Parameter der in den Kontrollgruppen gemessenen Ströme legen nahe, dass die CA1- und CA3-Neurone jeweils ihre eigene individuelle Zusammensetzung dieser Kalziumstrom-Subtypen besitzen. Das wiederum könnte zu unterschiedlichen Parametern der Gesamt-Zellströme führen. Da das $V_{h,i}$ der CA1-Region bei höheren Werten liegt als das der CA3-Region, kann man annehmen, dass dementsprechend die langsam inaktivierenden L-Typ-Kanäle in CA1-Zellen einen grösseren Anteil einnehmen als in CA3-Zellen.

Wie bereits im Ergebnis-Teil angeführt, zeigten alle in diesem Experiment bestimmten Kalziumstromeigenschaften signifikante Unterschiede zwischen den beiden Zellregionen (für Werte siehe 5.4). Damit ist es verständlich, dass, in Abhängigkeit von Zusammensetzung und Menge der Kanalsubtypen in den verschiedenen Hippokampusregionen, eine kortikale Läsion eine Verschiebung der $V_{h,i}$ -Werte dieser Regionen in entgegengesetzte Richtungen zur Folge haben kann. Dies wird erhärtet durch eine aktuelle Studie, in der die Expression von N-Typ-Kalziumkanälen Unterschiede zwischen der CA1- und der CA3-Region zeigte, nachdem Anfälle durch „kindling“ induziert worden waren. Hierbei fiel die gesteigerte Expression der N-Typ-Kanäle in den CA1-Zellen stärker aus und hielt länger an als in den CA3-Zellen (Bernstein et al., 1999). Die vorliegende Arbeit stützt somit die These, dass innerhalb des Hippokampus erhebliche Unterschiede in den Kalziumstromeigenschaften bestehen, wenn man die Regionen CA1 und CA3 miteinander vergleicht.

In Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen konnten auch in vorhergehenden Studien Veränderungen hippokampaler wie auch kortikaler Neurone nach zerebralem Infarkt beobachtet werden, die nicht in unmittelbarer räumlicher Nachbarschaft zum Läsionsort liegen (Reinecke et al., 1999; Buchkremer-Ratzmann und Witte 1997). Die Ergebnisse von Redecker et al. (Redecker et al., 2000), die eine Herunterregulierung der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten im ipsilateralen Hippokampus nach freeze-lesion-induzierter kortikaler Malformation zeigten, lassen auf einen Anstieg der Erregbarkeit der ipsilateralen Hippokampusformation schliessen. Ausserdem konnte nach photothrombotischen Infarkten im somatosensorischen Kortex eine gesteigerte Entladungsfrequenz und eine verminderte GABA_A-Rezeptor-Expression in den umliegenden Arealen beobachtet werden (Schiene et al., 1996). Ein weiterer Beleg für die gesteigerte Neuroplastizität nach einer kortikalen Schädigung ist die Beobachtung von gesteigerten LTPs im direkten Umfeld der Läsion (Huemmeke et al., 2004). Es konnte auch am Modell der Ratte gezeigt werden, dass nach einer cerebralen photothrombotischen Läsion im Repräsentationsort der Vibrissen eine Vibrissenstimulation im Versuch zu einer deutlich verstärkten cerebralen Antwort führte. Hierbei zeigte sich verstärkte Aktivität im ipsilateralen ungeschädigten Repräsentationszentrum und ebenso in Regionen,

die normalerweise keinen spezifischen Bezug zu den Vibrissen aufweisen (Jablonka und Kossut, 2006). Deutliche Veränderungen der Erregbarkeit des neuronalen Netzwerks sind auch durch die beschriebene Neurogenese-Steigerung im Gyrus dentatus der Ratte nach kortikalen Läsionen durch MCAO (Arvidsson et al., 2001) sowie durch Photothrombose (Kluska et al., 2005) zu erwarten. Eine andere Studie zeigte, dass es trotz der Induktion massiver Infarkte durch MCAO zu keiner Veränderung der kortikalen Kalziumströme kam. Dennoch konnte ein deutlicher Anstieg der Kalziumleitfähigkeit von kontralateral zur Läsion gelegenen Neuronen beobachtet werden (Bruehl et al., 2000a). Auch Gliazellen reagieren auf kleine Infarkte mit Änderung ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften. Dies konnte durch eine beträchtliche Heraufregulation der L-Typ-Kalziumkanäle in reaktiven Astrozyten, ausgelöst durch eine Läsion im Hippokampus, belegt werden (Westenbroek et al., 1998). Zudem ist bekannt, dass eine fokale cerebrale Ischämie am Modell der Ratte zu deutlichen Veränderungen, wie verminderter Vernetzung der Purkinjezellen und vermindertem Blutfluss, im cerebellären Kortex führt (Gold und Lauritzen, 2002).

Betrachtet man die Auswirkungen des Trainings einer beeinträchtigten Funktion nach einer entsprechenden kortikalen Schädigung, so konnte beispielsweise am Modell der Ratte im Bereich der Extremitäten ein deutlicher Trainingseffekt nachgewiesen werden. Hierbei steigerte sich die räumliche Koordinationsfähigkeit der Extremität, und weiterhin konnte eine gesteigerte Neurogenese im Hippokampus belegt werden. Die Effekte waren jedoch bei den Kontroll-Tieren ohne kortikale Läsion noch stärker ausgeprägt (Wurm et al., 2007). Ebenso konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zu Kontroll-Tieren die trainingsbedingte neuronale Plastizität in zu einer kortikalen Läsion benachbarten Gebieten direkt nach dem ischämischen Ereignis beeinträchtigt ist (Jablonka et al., 2007). Insgesamt unterstreichen die genannten Versuche die Bedeutung des neuroplastischen Potentials, welches sowohl beim ungeschädigten Gehirn als auch nach einer zerebralen Läsion wesentlich durch gezieltes Training günstig beeinflusst werden kann.

Bei der Frage nach der Bedeutung von Kalziumstromeigenschaften in Nervenzellen, insbesondere nach ischämischen Läsionen, gibt es unterschiedliche Ansätze: Es konnte gezeigt werden, dass Kalziumströme einen wesentlichen Einfluss auf das input-output-Verhalten pyramidalen CA1-Neurone haben (Andreasen und

Nedergaard 1996). Andere Studien belegen die grosse Bedeutung des freien intrazellulären Kalziums für synaptische Plastizität wie Long-term potentiation (LTP) (Isomura und Kato 1999). Da LTP als Voraussetzung für Lernen und Gedächtnis angesehen wird, kann eine wichtige Rolle der spannungsabhängigen Kalziumströme von pyramidalen Hippokampuszellen bei Anpassungsvorgängen vermutet werden, die nach ischämischer Gewebeschädigung stattfinden.

Nervenimpulse aus der Schicht II des entorhinalen Kortex erreichen den Hippocampus über den Gyrus dentatus, von wo sie zur CA3-Region weitergeleitet und schliesslich über die CA1-Region zum entorhinalen Kortex (Schicht V) zurückgesandt werden. Die Veränderungen des $V_{h,i}$, die in der vorliegenden Studie zutage traten, können solche Signale in entscheidender Weise beeinflussen. Die vorliegenden Daten erlauben die Vermutung, dass die Gesamtantwort hierdurch verstärkt werden kann. Die Neurone der CA3-Region sind eingebunden in eine Erregungsbahn, die als rückwirkende erregende Schleife die Antwort dieser Nervenzellen verstärken könnte. Die Verschiebung des $V_{h,i}$ der CA3-Neurone in Richtung positiverer Werte führte zu einer Verstärkung des auslösbaren Stroms, was durch die rückwirkende Verstärkung zu einem intensivierten kalziumvermittelten Signal an die CA1-Region führen kann. Dieser verstärkte Impuls dürfte den Verlust an Kalziumstrom in den CA1-Zellen überwiegen, der durch die Verschiebung des $V_{h,i}$ dieser Zellen hin zu negativeren Werten verursacht wird. Daraus könnte eine gesteigerte Erregbarkeit des Hippokampusnetzwerks resultieren (siehe Abb.12).

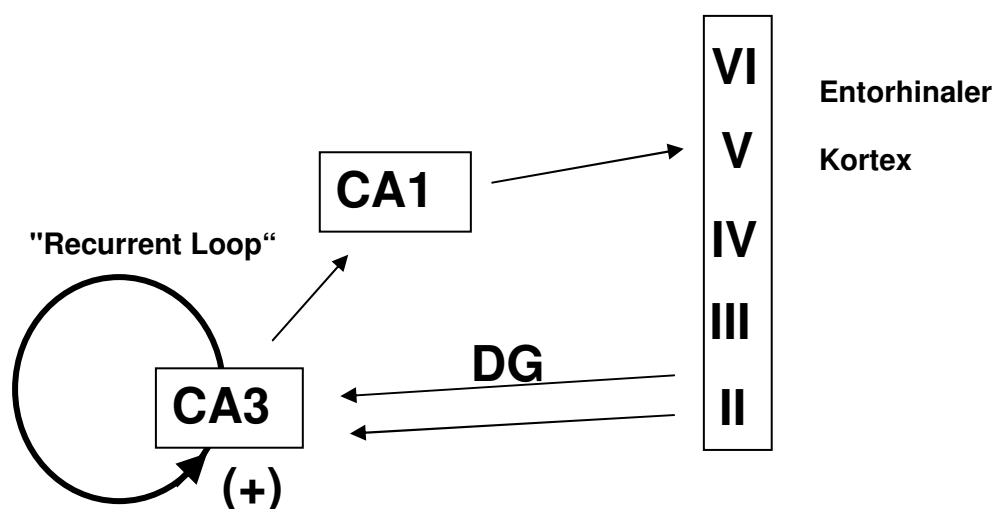


Abb.12: Erregungsbahnen vom entorhinalen Kortex über den Hippocampus und zurück zum entorhinalen Kortex mit Verstärkung der Signale durch eine rückwirkende erregende Schleife in CA3.

Ein Anstieg der Hippokampus-Erregbarkeit begünstigt die Entstehung von long-term potentiation (LTP), die mit neuronaler Plastizität und Lernen in Verbindung gebracht wird (Davis et al., 2004; Kemp und Manahan-Vaughan, 2004). In diesem Zusammenhang konnte die erleichterte Entstehung von LTP im Kortex ipsilateral zu einer photothrombotischen Gewebeschädigung durch Hagemann et al. nachgewiesen werden (Hagemann et al., 1998). LTP im Hippokampus nach einem Substanzverlust im Kortex könnte dem Gehirn helfen, den Funktionsverlust auszugleichen, der durch die Schädigung kortikaler Areale entstanden ist.

Einige Autoren halten die Blockierung neuronaler Kalziumkanäle nach Ischämie für eine effektive neuroprotektive Massnahme, die in der Lage ist, das Infarktvolumen zu reduzieren (Caputi et al., 2001; Barone et al., 1994; Ito et al., 1994). Dieser Theorie liegt die Vorstellung zugrunde, dass der massive Kalziumeinstrom in die ischämiegeschädigten Zellen zu deren Untergang führe.

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Daten und die vorbestehenden Studienergebnisse, dass eine kleine Läsion im Kortex zu ausgedehnten Veränderungen in der Erregbarkeit des neuronalen Netzwerks führen kann, sowohl im Kortex als auch in den Strukturen des Hippocampus. Daneben konnte beim Vergleich der Hippokampusregionen CA1 und CA3 ein deutlicher Unterschied in den Kalziumstromeigenschaften gezeigt werden, sowohl bei der Reaktion auf die photothrombotische Läsion als auch unabhängig davon in der Gegenüberstellung der Kontrollgruppen. Dieses Ergebnis stützt die These einer unterschiedlichen Zusammensetzung der Kalziumkanäle in den beiden Hippokampusregionen.

7. Schlussfolgerungen

Die vorliegende Studie liefert den Nachweis, dass die Kalziumstromeigenschaften hippokampaler Neurone der CA1- und der CA3-Region nach einer photothromboseinduzierten kortikalen Läsion einer deutlichen Veränderung unterliegen. Sie belegt zudem die Annahme, dass sich die Zusammensetzung der Kalziumströme aus ihren verschiedenen Untereinheiten zwischen Zellen der CA1- und der CA3-Region unterscheidet. Durch Patch-Clamp-Messungen mit Ganzzellableitung konnte gezeigt werden, dass es nach Induktion einer kortikalen Läsion zu einer Verschiebung des Potentials der halbmaximalen Inaktivierung ($V_{h,i}$) von hippokampalen Kalziumströmen kam. Die festgestellten Veränderungen blieben auf diesen Parameter ($V_{h,i}$) begrenzt, wobei das $V_{h,i}$ der CA1-Zellen einer Negativ-Verschiebung, das der CA3-Zellen einer Positiv-Verschiebung unterlag.

Ein aufschlussreiches Resultat der vorliegenden Arbeit, das an die Ergebnisse anderer Studien anknüpft, ist auch der signifikante Unterschied, der im Vergleich der beiden Hippokampusregionen in allen analysierten Kalziumstromeigenschaften (Kontrollgruppen) belegt werden konnte. Dies unterstützt die Annahme, dass bei den Kalziumkanälen der CA1-Neurone eine andere Gewichtung der Kanalsubtypen vorliegt als bei den Kalziumkanälen der CA3-Neurone. Hieraus würden wiederum die einander entgegengesetzten Veränderungen des $V_{h,i}$ in CA1 und CA3 verständlich. Aufgrund der oben beschriebenen Verschaltungen des Hippokampus kann spekuliert werden, dass seine Signalantwort im Gesamten durch die $V_{h,i}$ -Verschiebung verstärkt wird.

Da eine erhöhte Erregbarkeit des Hippokampus die Entstehung von long-term potentiation fördert und dieses als Voraussetzung für neuronale Plastizität und Lernen angesehen wird, darf vermutet werden, dass die aufgezeigten Veränderungen dem Gehirn helfen könnten, den Funktionsverlust nach einer ischämischen Läsion auszugleichen. In jedem Fall kommt es nach einer kleinen kortikalen Läsion zu deutlichen Veränderungen der Erregbarkeit des neuronalen Netzwerks, nicht nur im Kortex selbst, sondern auch in den Strukturen des Hippokampus.

Anknüpfend an die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dürfte es aufschlussreich sein, durch nachfolgende Studien zu klären, welche weiteren Hirnareale infolge einer kortikalen Läsion ähnlichen Veränderungen unterliegen und über welche Zelleigenschaften sich diese charakterisieren lassen. Ein weiterer Schritt liegt in der Klärung der Auswirkung solcher Veränderungen, vor allem in der Differenzierung, ob es sich dabei um nützliche Reparaturvorgänge handelt oder um zusätzliche Schädigungsmechanismen.

Ausserdem sollte noch eingehender der Frage nachgegangen werden, welche weiteren Unterschiede in den Stromeigenschaften der Hippokampusregionen CA1 und CA3 bestehen, woraus diese resultieren und wie sich diese Eigenschaften auf das Signalverhalten des Hippokampus auswirken.

Teile der Arbeit wurden unter dem Titel „Differential alterations of the inactivation properties of high voltage activated calcium currents in area CA1 and CA3 of the rat following photothrombotic lesion” von S.M. Diehm, O.W. Witte und C. Bruehl veröffentlicht und erschienen in Neuroscience Letters 341 (2003) 147-150.

8. Literaturverzeichnis

1. Andreasen M and Nedergaard S (1996) Dendritic electrogenesis in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons: functional aspects of Na⁺ and Ca²⁺ currents in apical dendrites. *Hippocampus* 6:79-95.
2. Arvidsson A, Kokaia Z, and Lindvall O (2001) N-methyl-D-aspartate receptor-mediated increase of neurogenesis in adult rat dentate gyrus following stroke. *Eur.J.Neurosci.* 14:10-18.
3. Barone FC, Price WJ, Jakobsen P, Sheardown MJ, and Feuerstein G (1994) Pharmacological profile of a novel neuronal calcium channel blocker includes reduced cerebral damage and neurological deficits in rat focal ischemia. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 48:77-85.
4. Bernstein GM, Mendonca A, Wadia J, Burnham WM, and Jones OT (1999) Kindling induces a long-term enhancement in the density of N-type calcium channels in the rat hippocampus. *Neuroscience* 94:1083-1095.
5. Broadbent NJ, Squire LR, and Clark RE (2004) Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101:14515-14520.
6. Bruehl C, Neumann-Haefelin T, and Witte OW (2000a) Enhancement of whole cell calcium currents following transient MCAO. *Brain Res.* 884:129-138.

7. Bruehl C, Neumann-Haefelin T, and Witte OW (2000b) Enhancement of whole cell calcium currents following transient MCAO. *Brain Res.* 884:129-138.
8. Bruehl C and Wadman WJ (1999) Calcium currents in acutely isolated stellate and pyramidal neurons of rat entorhinal cortex. *Brain Res.* 816:554-562.
9. Bruehl C, Wadman WJ, and Witte OW (2000c) Concentration dependence of bicarbonate-induced calcium current modulation. *J.Neurophysiol.* 84:2277-2283.
10. Buchkremer-Ratzmann I and Witte OW (1997) Extended brain disinhibition following small photothrombotic lesions in rat frontal cortex. *Neuroreport* 8:519-522.
11. Caputi L, Hainsworth AH, Lavaroni F, Leach MJ, McNaughton NC, Mercuri NB, Randall AD, Spadoni F, Swan JH, and Stefani A (2001) Neuroprotective actions in vivo and electrophysiological actions in vitro of 202W92. *Brain Res.* 919:259-268.
12. Davis CD, Jones FL, and Derrick BE (2004) Novel environments enhance the induction and maintenance of long-term potentiation in the dentate gyrus. *J.Neurosci.* 24:6497-6506.
13. Huemmeke M, Eysel UT, Mittmann T (2004) Lesion-induced enhancement of LTP in rat visual cortex is mediated by NMDA receptors containing the NR2B subunit. *J.Physiol.* 559(Pt 3):875-82.

14. Gold L and Lauritzen M (2002) Neuronal deactivation explains decreased cerebellar blood flow in response to focal cerebral ischemia or suppressed neocortical function. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99:7699-7704.
15. Grivas I, Michaloudi H, Batzios C, Chiotelli M, Papatheodoropoulos C, Kostopoulos G, and Papadopoulos GC (2003) Vascular network of the rat hippocampus is not homogeneous along the septotemporal axis. *Brain Res.* 971:245-249.
16. Hagemann G, Redecker C, Neumann-Haefelin T, Freund HJ, and Witte OW (1998) Increased long-term potentiation in the surround of experimentally induced focal cortical infarction. *Ann.Neurol.* 44:255-258.
17. Hille, B: Ion channels of excitable membranes. Sinauer Associates, Inc. (1991) S. 196.
18. Isomura Y and Kato N (1999) Action potential-induced dendritic calcium dynamics correlated with synaptic plasticity in developing hippocampal pyramidal cells. *J.Neurophysiol.* 82:1993-1999.
19. Ito C, Im WB, Takagi H, Takahashi M, Tsuzuki K, Liou SY, and Kuniyara M (1994) U-92032, a T-type Ca^{2+} channel blocker and antioxidant, reduces neuronal ischemic injuries. *Eur.J.Pharmacol.* 257:203-210.
20. Jablonka J, Kossut M (2006) Focal stroke in the barrel cortex of rats enhances ipsilateral response to vibrissal input. *Acta.Neurobiol.Exp.* 66(3):261-6.

21. Jablonka JA, Witte OW, Kossut M (2007) Photothrombotic infarct impairs experience-dependent plasticity in neighboring cortex. *Neuroreport*. 18(2):165-9.
22. Karhunen H, Bezvenyuk Z, Nissinen J, Sivenius J, Jolkkonen J, Pitkänen A (2007) Epileptogenesis after cortical photothrombotic brain lesion in rats. *Neuroscience* 148(1):314-24.
23. Kemp A and Manahan-Vaughan D (2004) Hippocampal long-term depression and long-term potentiation encode different aspects of novelty acquisition. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101:8192-8197.
24. Kluska MM, Witte OW, Bolz J, Redecker C (2005) Neurogenesis in the adult dentate gyrus after cortical infarcts: effects of infarct location, N-methyl-D-aspartate receptor blockade and anti-inflammatory treatment. *Neuroscience* 135(3):723-35.
25. Numberger M und Draguhn A: Patch-Clamp-Technik. Heidelberg, Spektrum, Akad. Verl. (1996) S.88-91.
26. Redecker C, Luhmann HJ, Hagemann G, Fritschy JM, and Witte OW (2000) Differential downregulation of GABAA receptor subunits in widespread brain regions in the freeze-lesion model of focal cortical malformations. *J.Neurosci.* 20:5045-5053.

27. Reinecke S, Lutzenburg M, Hagemann G, Bruehl C, Neumann-Haefelin T, and Witte OW (1999) Electrophysiological transcortical diaschisis after middle cerebral artery occlusion (MCAO) in rats. *Neurosci.Lett.* 261:85-88.
28. Schiene K, Bruehl C, Zilles K, Qu M, Hagemann G, Kraemer M, and Witte OW (1996) Neuronal hyperexcitability and reduction of GABAA-receptor expression in the surround of cerebral photothrombosis. *J.Cereb.Blood Flow Metab* 16:906-914.
29. Till U: Pathophysiologie/Pathobiochemie systematisch. UNI-MED Verlag AG, Bremen (1999) S. 468-473.
30. Wardlaw JM, Zoppo G, Yamaguchi T, and Berge E (2003) Thrombolysis for acute ischaemic stroke. *Cochrane.Database.Syst.Rev.*CD000213.
31. Westenbroek RE, Bausch SB, Lin RC, Franck JE, Noebels JL, and Catterall WA (1998) Upregulation of L-type Ca²⁺ channels in reactive astrocytes after brain injury, hypomyelination, and ischemia. *J.Neurosci.* 18:2321-2334.
32. Witte OW (1987) Calcium Ion Involvement in Epileptogenesis. *Am.J.EEG Technol.*
33. Witte OW, Bidmon HJ, Schiene K, Redecker C, and Hagemann G (2000) Functional differentiation of multiple perilesional zones after focal cerebral ischemia. *J.Cereb.Blood Flow Metab* 20:1149-1165.

34. Witte OW and Freund HJ (1999) Neuronal dysfunction, epilepsy, and postlesional brain plasticity. *Adv.Neurol.* 81:25-36.
35. Wurm F, Keiner S, Kunze A, Witte OW, Redecker C (2007) Effects of skilled forelimb training on hippocampal neurogenesis and spatial learning after focal cortical infarcts in the adult rat brain. *Stroke* 38(10):2833-40.
36. Zilles K: Funktionelle Neuroanatomie. Springer, Heidelberg (1994) S. 115.

9. Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. O. W. Witte für die freundliche Überlassung des Themas und die umfassende fachliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit, die mir einen umfangreichen Einblick in die Techniken des wissenschaftlichen Arbeitens gewährt hat.

Ebenso herzlich möchte ich mich bei Herrn Dr. C. Bruehl bedanken, der mir als Betreuer des Projektes jederzeit hilfreich zur Seite stand und stets alle Verständnisprobleme sowie technischen Schwierigkeiten mit viel Geduld aus dem Weg geräumt hat.

Auch bei den anderen Mitarbeitern der experimentellen Neurologie der Universität Jena möchte ich mich für die Unterweisung in den verschiedenen Arbeitstechniken und ihre ständige Hilfsbereitschaft bedanken, und nicht zuletzt für die heitere, freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Sehr herzlich danke ich meinen Eltern, die mir das Medizin-Studium erst ermöglicht und mich immer durch ihr Vertrauen und ihre Unterstützung ermutigt haben.

Ein weiterer persönlicher Dank gilt Karolina Vetter für ihre verständnisvolle Hilfsbereitschaft und meinen Freunden Greta und Marcel Pawlowski sowie Peter Wild für die vielen heiteren Stunden, die mir den nötigen Ausgleich zu der oft anstrengenden Arbeit gegeben haben.

10. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Adresse	Stephan Marcus Diehm Uhlandstrasse 15 83024 Rosenheim
geboren am	17.05.1977
geboren in	Wertheim am Main
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Ausbildung

1984 – 1988	Grundschule, Wertheim-Dertingen
1988 – 1997	Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium, Wertheim
Juni 1997	Abitur
Oktober 1997	Aufnahme des Medizinstudiums an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
September 1999	Ärztliche Vorprüfung an der FSU Jena
September 2000	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung an der FSU Jena
seit Oktober 2001	Dissertation über die Auswirkung kortikaler photothrombotischer Läsionen auf die Eigenschaften von HVA-Kalziumströmen im Hippokampus der Ratte, eine Patch-Clamp-Studie, in der Experimentellen Neurologie der FSU Jena unter Leitung von Herrn Prof. Dr. O.W. Witte
Februar 2003	Veröffentlichung der Studienergebnisse in Neuroscience Letters
April 2003	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung an der FSU Jena
April 2003	Studienplatzwechsel an die Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen und Beginn des Praktischen Jahres
Mai 2004	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung an der FAU Erlangen

Berufliche Tätigkeit

August 2004	Arzt im Praktikum bzw. Assistenzarzt im Klinikum Fürth, Medizinische Klinik II unter Prof. Dr. Schneider
September 2005	Assistenzarzt in der Neurologischen Klinik des Klinikums Nürnberg unter Prof. Dr. Erbguth
seit Oktober 2006	Assistenzarzt in der Psychiatrischen Klinik des Inn-Salzach- Klinikums in Wasserburg am Inn unter Prof. Dr. Laux.

Stephan M. Diehm

11. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich,

dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

dass ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

dass mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. O.W. Witte, Dr. Claus Bruehl,

dass die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Stephan M. Diehm